

0-772313

На правах рукописи



**УСТЮГОВ Яков Юрьевич**

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕСКЛЕТОЧНОЙ  
КОКЛЮШНОЙ ВАКЦИНЫ**

**03.00.07 Микробиология**

**14.00.36 Аллергология и иммунология**

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук**

**Пермь - 2008**

Работа выполнена в лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь и в лаборатории комбинированных вакцин филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ и СР РФ «Пермское НПО «Биомед»

**Научные руководители:**

доктор биологических наук **Николаева Алла Максимовна**  
кандидат медицинских наук, доцент **Шиллов Юрий Иванович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор **Маслов Юрий Николаевич**

доктор биологических наук, профессор **Ребров Анатолий Яковлевич**

**Ведущая организация:** ГОУ ВПО «Санкт-петербургская педиатрическая медицинская академия».

Защита состоится "4" сентября 2008 г., в 10 часов на заседании диссертационного совета ДМ004.019.01 в Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Факс (342) 244 67 11.

Автореферат диссертации размещен на сайте Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (<http://www.iegim.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Автореферат разослан "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук



**Максимова Юлия Геннадьевна**

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000429037

**Актуальность проблемы.** Заболеваемость коклюшем остается серьезной проблемой не только российского, но и зарубежного здравоохранения. Ежегодно в мире заболевает коклюшем около 60 млн. человек, а умирает от него около 1 млн. (Селезнева и др., 2002).

Многолетняя практика применения АКДС-вакцины, содержащей цельноклеточный коклюшный компонент, доказала его профилактическую эффективность. При достаточно высоком охвате вакцинацией, АКДС обеспечивает защиту более 85% привитых (Чупринина и др., 2005). Однако цельноклеточная коклюшная вакцина при всех ее положительных свойствах является одним из наиболее реактогенных препаратов, включенных в национальные календари прививок разных стран (Mattoo, Cherry, 2005). Накоплены данные о разнообразных проявлениях реактогенности АКДС-вакцины, обусловленных цельноклеточным коклюшным компонентом (Медуницын, 2004, Сухинин, 2005). Потребность в менее реактогенном препарате послужила основанием для разработки вакцин нового поколения на основе протективных антигенов *Bordetella pertussis*. Первая бесклеточная коклюшная вакцина была зарегистрирована в Японии в 1981 г. В последующем в Европе и США было создано более 20 подобных препаратов, отличающихся по составу антигенов, методам очистки, методу инактивации токсина, адъювантам (Капио и др., 2005). Некоторые из них в виде монопрепарата или компонента комбинированных вакцин стали коммерческими, зарегистрированы и применяются на практике во многих странах, включая Россию. Отечественные бесклеточные коклюшные компоненты вакцины АКДС (Захарова и др., 1998; Москаленко и др., 2001) пока не вышли из стадии научно-исследовательской разработки.

Известные бесклеточные коклюшные вакцины содержат в своем составе от 1 до 5 и более протективных антигенов. Тем не менее, вопрос об оптимальном составе бесклеточных коклюшных вакцин не решен, поскольку представляется неясным, какие именно составляющие являются ведущими в формировании противококлюшного иммунитета. В связи с этим представляется необходимой максимально полная доклиническая оценка потенциальных кандидатов в вакцины календаря прививок в сравнении с цельноклеточным аналогом, эпидемиологическая эффективность которого подтверждена сорокалетней практикой.

В Пермском филиале ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед» на основе базовых исследований Л.И. Райхера с сотрудниками (1970-1989 гг) разработана технология получения бесклеточного коклюшного препарата на основе комплекса соматических антигенов коклюшного микроба (патент РФ 2332231).

**Целью настоящей работы** явилось проведение лабораторно-экспериментального (доклинического) исследования иммунобиологических свойств разработанного бесклеточного коклюшного препарата.

### Основные задачи исследования

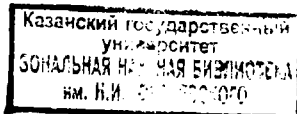
1. Оценить токсичность и алергизирующее действие бесклеточного коклюшного препарата.
2. Изучить иммуногенность бесклеточного коклюшного препарата на экспериментальных животных.
3. Сконструировать комбинированную вакцину для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша с использованием бесклеточного коклюшного компонента и оценить ее иммуногенность на экспериментальных животных.

**Научная новизна.** Впервые проведена комплексная оценка токсичности и иммуногенной активности отечественного бесклеточного коклюшного препарата в сравнении с используемой цельноклеточной вакциной. В экспериментах показано отсутствие у бесклеточной коклюшной вакцины токсичности, алергизирующей, гистаминсенсибилизирующей и лейкоцитозстимулирующей активностей. Новая бесклеточная коклюшная вакцина подобно цельноклеточной защищает мышей от интрацеребрального заражения вирулентным штаммом *Bordetella pertussis* 18323, вызывает образование специфических антител, повышает пролиферативный ответ лимфоцитов в культурах с коклюшной суспензией, обеспечивает протективную активность в тесте сингенного переноса спленоцитов. Протективная активность и аффинность антител, образующихся в ответ на иммунизацию бесклеточным и цельноклеточным препаратами, оказались сходными. Пролиферативный ответ лимфоцитов *in vitro* на фитогемагглютинин после иммунизации бесклеточной коклюшной вакциной выше, чем после иммунизации цельноклеточной. Патоморфологические исследования показали значительно меньшую степень выраженности вторичной альтерации в тесте гиперчувствительности при введении бесклеточного препарата.

### Теоретическое и практическое значение работы.

Полученные результаты уточняют представления о природе приобретённой противококлюшной резистентности. Принципиально важно, что новая бесклеточная коклюшная вакцина обладает сходной с традиционной цельноклеточной вакциной протективной активностью и иммуногенностью при меньшей токсичности.

Проведенные исследования – существенная часть доклинических испытаний новых вакцин на пути их продвижения в практику, в частности, для представления в Государственный Институт стандартизации и контроля им. Л.И. Тарасевича. Результаты исследований используются в лекционных курсах "Иммунология", "Экспериментальная иммунопатология и иммунотерапия" кафедры микробиологии и иммунологии ГОУ ВПО "Пермский государственный университет" (614600, г. Пермь, ул. Букирева, 15). В лекционном курсе «Биотехнология» кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ГОУ ВПО "Пермская государственная фармацевтическая академия" (614990, г. Пермь, ул. Ленина, 48).



### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Бесклеточный коклюшный препарат обладает более низкой токсичностью и аллергизирующей активностью в сравнении с цельноклеточной вакциной.

2. Новая бесклеточная коклюшная вакцина подобно цельноклеточной защищает мышей от интрацеребрального заражения вирулентным штаммом *Bordetella pertussis* 18323 и формирует клетки иммунологической памяти, которые функционируют при сингенном переносе протективного иммунитета.

3. Бесклеточная и традиционная цельноклеточная коклюшные вакцины обладают сопоставимой способностью к индукции иммунного ответа. Стимулирующее влияние бесклеточного препарата на пролиферацию Т-лимфоцитов в культурах с фитогемагглютинином более выражено, а проявления вторичной альтерации при реакции гиперчувствительности менее значительны.

4. Замена в вакцине АКДС цельноклеточного коклюшного компонента на новый бесклеточный создает новую комбинированную вакцину, которая не уступает традиционной по иммуногенной активности.

**Апробация работы и публикации.** Основные положения работы доложены на Межрегиональной конференции молодых ученых «Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии», Пермь, 2002; Международной конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 2004; Международной научной конференции «Студент и научно-технический прогресс», Новосибирск, 2005; Всероссийской научно-практической конференции «Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов», Пермь, 2008; Объединенном иммунологическом форуме, Санкт-Петербург, 2008. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 118 стр. машинописного текста, содержит 28 таблиц и 10 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав экспериментальных исследований, обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 149 источников литературы, из них 37 отечественных и 112 иностранных авторов.

**Связь работы с научными программами.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с основным планом НИР Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (номер госрегистрации темы 01.9.70 009928) и Филиала государственного унитарного предприятия «НПО «Микроген» Минздрава России «Пермское НПО «Биомед».

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы.**

**Вакцинные препараты.** В работе использовали бесклеточный и цельноклеточный коклюшные препараты производства филиала ФГУП НПО «Микроген» «Пермское НПО «Биомед» (рис. 1.).



Рис 1. Схема получения цельноклеточного и бесклеточного коклюшных препаратов.

Кроме того, в работе использованы коммерческие комбинированные вакцины: АКДС, содержащая цельноклеточный коклюшный компонент, и Инфанрикс (ГласкоСмитКляйн, Бельгия) с бесклеточным коклюшным компонентом, а также экспериментальная вакцина аАКДС, в которой цельноклеточный коклюшный компонент был заменён на бесклеточный. В работе были использованы следующие отраслевые стандарты: ОСО-3 (иммуногенности коклюшной вакцины), ОСО-5 (гистаминсенсibilизирующей активности коклюшной вакцины).

**Экспериментальные животные.** Экспериментальные исследования в системе *in vivo* выполнены на 600 белых аутбредных мышках-самцах массой 16-18 г (цех лабораторных животных филиала «Пермское НПО «Биомед»), 640 самцах-гибридах первого поколения мышей линий (CBA×C57BL/J6) $F_1$  (Питомник РАМН «Столбовая») массой 10 – 12 г, 200 самцах мышей линии BALB/c (Питомник РАМН «Столбовая») массой 14 - 16 г, 150 нелинейных морских свинок массой 250 - 300 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария на стандартной диете.

**Токсичность и аллергизирующая активность.** Опыты по исследованию острой и хронической токсичности препарата проводили согласно основным положениям РД 42-28-8-89 «Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов» (М., 1989).

Исследование токсичности в тесте изменения массы мышей, определение гистаминсенсibilизирующей и лейкоцитозстимулирующей активности прово-

дили согласно «Инструкции по отбору, проверке и хранению производственных штаммов коклюшных бактерий» (М., 1987).

Аллергизирующее действие препарата оценивали в тесте гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ). Мышам вводили внутривенно вакцинную дозу цельноклеточного (10 млрд) и бесклеточного препаратов (0,15 мг). Через 7 суток вводили удвоенную дозу препаратов, учет числа выживших животных вели через 24 ч после повторного введения.

**Протективную активность** коклюшных препаратов определяли в тесте внутримозгового заражения иммунизированных мышей вирулентным штаммом *B. pertussis* 18323. Заражающая доза вирулентного штамма составляла не менее 100 LD<sub>50</sub>.

**Гуморальный иммунный ответ** оценивали в опытах на морских свинках и кроликах. Титр коклюшных антител в сыворотках животных определяли в реакции агглютинации (РА) и с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем, разработанных в филиале ФГУП НПО «Микроген» «Пермское НПО «Биомед» (Николаева, 2003).

Протективную активность коклюшных антител оценивали в реакциях пассивной защиты и нейтрализации. Тест пассивной защиты проводили на белых аутбредных мышах, которым предварительно вводили внутривенно различные разведения сывороток, определяя дозу сыворотки (ЕД<sub>50</sub>), защищающей 50% мышей от заражения 450-500 LD<sub>50</sub> вирулентного штамма *B. pertussis* 18323. Реакцию нейтрализации проводили по следующей схеме: последовательные разведения вирулентного штамма *B. pertussis* 18323 инкубировали с сыворотками в течение 30 мин, затем интрацеребрально вводили белым аутбредным мышам. Рассчитывали число LD<sub>50</sub> штамма *B. pertussis* 18323, нейтрализуемого сывороткой. Аффинность антител оценивали иммуноферментным методом, используя для отмывки 8М раствор мочевины (Kashanian *et al.*, 2008). Индекс аффинности (ИА) рассчитывали по формуле  $ИА = (ОП2/ОП1) \times 100\%$ , где ОП1 – оптическая плотность лунок промытых буферным раствором, ОП2 – оптическая плотность лунок промытых раствором мочевины.

**Пролиферативный ответ лимфоцитов.** Выраженность иммунного ответа по пролиферативной активности лимфоцитов крови оценивали в культуре клеток, содержащей  $2 \times 10^5$  лейкоцитов/лунку, общий объем культуры - 0,2 мл. В качестве антигена использовали коклюшную суспензию в концентрации 50 млрд/мл. Через 72 ч учитывали включение <sup>3</sup>H-тимидина на счетчике Wallac 1414 WinSpectral DSA Guardian (США) в подразделении радиоизотопных исследований аналитической лаборатории ИЭГМ УрО РАН. Для дополнительной оценки иммуномодулирующего действия вакцинных препаратов у тех же животных проводили оценку бласттрансформации лимфоцитов в культурах с фитогемагглютинином-П (ФГА, Sigma, L-9132, США в концентрациях 5; 10; 20 мкг/мл).

**Адоптивный перенос иммунитета.** Способность к накоплению клеток иммунологической памяти и эффекторных клеток характеризовали тесте адоптивного переноса иммунитета на мышах линии BALB/с. Спленоциты мышей-доноров, полученные на 14-е сутки после однократного введения препаратов в вакцинной дозе, вводили мышам-реципиентам внутрибрюшинно в дозе  $3 \times 10^6$  клеток. На следующие сутки животных-реципиентов заражали вирулентной культурой *B. pertussis* 18323 (100 LD<sub>50</sub>). Через 14 суток определяли процент выживаемости в группах животных.

**Гиперчувствительность замедленного типа.** С учетом важной роли реакций Th1-типа в иммунитете при коклюше исследовали способность вакцинных препаратов к индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). При постановке ГЗТ вакцины вводили в подушечку стопы правой лапы в объеме 0,03 мл, в левую стопу вводили аналогичное количество изотонического раствора натрия хлорида. Повторное введение осуществляли через 7 суток. Учет результатов проводили через 24 ч по степени выраженности иммунного воспаления. Рассчитывали индекс реакции по формуле:  $(P_o - P_k) / P_k \times 100\% = \text{ИР}$ , где  $P_o$  - показатели массы и толщины в опытной конечности;  $P_k$  - то же в контрольной конечности. Исследование патоморфологических изменений проводили совместно с зав. кафедрой патологической анатомии ГОУ ВПО "Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера", д.м.н., профессором Г.Г. Фрейнд и к.м.н., доцентом той же кафедры А.Н. Крючковым. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для дополнительной оценки возможности развития других типов реакций гиперчувствительности исследовали выраженность воспаления через 6 ч после разрешающей инъекции антигена.

**Статистический анализ результатов.** Полученный материал обрабатывали с помощью методов вариационной статистики. Результаты в большинстве таблиц и на рисунках представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). Достоверность различий между двумя группами оценивали по непарному *t*-критерию Стьюдента. При множественных сравнениях использовали критерий Ньюмена-Кейлса. Различия или показатели связи считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Изучение токсичности и аллергизирующего действия бесклеточной коклюшной вакцины

При изучении бесклеточной коклюшной вакцины в тесте острой токсичности установлено, что при однократном внутрибрюшинном введении белым мышам и морским свинкам вакцинной дозы препарата не наблюдается снижения массы тела, образования воспалительных экссудатов, некробиотических



изменений. Применение бесклеточной вакцины при ежедневном внутримышечном введении в течение 10 дней в суммарной дозе 5,46 мкг для белых мышей, 36,56 мкг для морских свинок не вызывает гибели животных, изменения поведенческой и двигательной активности, снижения массы тела, что свидетельствует об отсутствии токсического действия препарата.

Согласно требованиям ВОЗ проведена сравнительная оценка токсичности бесклеточного и цельноклеточного коклюшных препаратов в тесте изменения массы мышей. Полученные результаты показывают, что все изученные вакцины соответствуют требованиям, предъявляемым к препаратам данного класса: прирост массы по отношению к контрольным животным составляет более 60% (табл. 1). В группе животных, получавших бесклеточный препарат, прирост массы выше, чем в группе животных, в которой использовали цельноклеточный препарат, что позволяет сделать вывод о меньшей токсичности бесклеточного препарата ( $p < 0,05$ ).

Таблица 1

**Характеристика токсических свойств бесклеточной вакцины в тестах изменения массы мышей и лейкоцитозстимулирующей активности**

№ серии препарата	Относительный прирост, %		Число лейкоцитов $\times 10^3/\text{мл}$			
	бесклеточная вакцина	корпускулярная вакцина	бесклеточная вакцина	корпускулярная вакцина	0,9% раствор NaCl	ОСО-3
1	111,0	91,8	5,76	19,36	4,50	22,72
2	100,9	85,7	4,64	20,48	3,00	21,44
3	101,0	87,0	3,68	20,00	4,12	24,96
4	93,7	90,4	5,44	24,00	3,75	47,36
5	97,8	76,1	6,08	19,36	5,44	23,68
6	100,2	73,4	3,68	23,52	4,25	30,40
7	95,7	72,1	4,48	19,20	3,70	22,40
8	110,0	69,3	4,16	12,16	4,52	21,76
9	-	-	5,12	17,76	3,16	29,28
10	-	-	7,84	23,52	4,86	30,88
M $\pm$ m	101,3	80,7 $\pm$	5,1 $\pm$	19,9 $\pm$ 1,2	4,1 $\pm$ 0,3	27,5 $\pm$
	$\pm 2,2$	2,3	0,3			2,7
ЛСА*	-	-	0,19	0,73	0,15	-

Примечание. \* - лейкоцитозстимулирующая активность по отношению к отраслевому стандартному образцу (ОСО-3).

Одной из характеристик токсичности коклюшных вакцинных препаратов является их способность вызывать лейкоцитоз, что связано с наличием недообезвреженного коклюшного токсина. Как видно из табл. 1, введение бесклеточного препарата практически не вызывает увеличения количества лейкоцитов.

В сравнении с цельноклеточной вакциной и отраслевым стандартным образцом (ОСО-5), бесклеточная вакцина не проявляет фармакотоксическую гистаминсенсibiliзирующую активность, также обусловленную недообезвреженным коклюшным токсином.

Из представленных данных видно (табл. 2), что не одна из изученных доз бесклеточного препарата не вызывает сенсibiliзации к действию гистамина.

Таблица 2

### Гистаминсенсibiliзирующая активность исследуемых препаратов

Препарат	Разведение	Количество животных в опыте	
		взято	выживших
ОСО-5	20 МОЕ/мл	5	0
	5 МОЕ/мл	5	1
	1 МОЕ/мл	5	3
Бесклеточный	1 мг/мл	5	5
	0,2 мг/мл	5	5
	0,04 мг/мл	5	5
	20 МОЕ – 1мл	5	2
	5 МОЕ – 1мл	5	4
Цельноклеточный	1 МОЕ – 1мл	5	5

Применение вакцинных препаратов может приводить к развитию сенсibiliзации и аллергических реакций немедленного типа. Установлено, что сенсibiliзирующий эффект бесклеточного препарата значительно меньше, в сравнении с цельноклеточной вакциной (табл. 3).

Таблица 3

### Аллергизирующее действие коклюшных препаратов

Препарат	Выживаемость (%) в тесте ГНТ
Бесклеточный	100,0
Цельноклеточный	27,7*

Примечание. \* -  $p < 0,01$  по  $t$ -критерию Стьюдента для долей.

## Исследование иммуногенной активности бесклеточного коклюшного препарата

Бесклеточная коклюшная вакцина проявляет стабильную протективную активность, которая, судя по доле выживших иммунизированных и заражённых в мозг мышей, не уступает активности цельноклеточного препарата (табл. 4).

Таблица 4

### Сравнительная оценка протективной активности коклюшных вакцин

№ серии препарата	Выживаемость, %	
	цельноклеточный препарат	бесклеточный препарат
1	62,5	100,0
2	75,0	88,2
3	83,3	87,5
4	62,5	75,0
5	93,3	83,3
6	76,9	93,3
7	81,3	93,8
8	87,5	86,6
M±m	77,8±4,5	88,5±3,1

Примечание. В каждой группе исходно 14 мышей. При определении выживших исключали мышей, павших в течение первых 72 ч после заражения.

Способность к накоплению клеток иммунологической памяти и эффекторных клеток характеризовали в тесте адоптивного переноса иммунитета. Адоптивный перенос противокклюшного иммунитета был воспроизведён как с цельноклеточной, так и с бесклеточной вакцинами (табл. 5). Однако перенос спленцитов от доноров, получивших гель алюминия гидроксида без вакцины, не вызывал у мышей-реципиентов резистентность к внутримозговому заражению коклюшными бактериями.

Таблица 5

### Показатель выживаемости в тесте адоптивного переноса иммунитета

Препарат	Число реципиентов	Число животных павших вследствие неспецифической гибели	Число выживших животных	Процент выживаемости
Корпускулярный	14	4	7	70
Бесклеточный	14	2	8	66,6
Гель Al(OH) <sub>3</sub>	14	4	0	0

Полученные данные указывают на то, что при иммунизации исследуемыми коклюшными препаратами формируется состояние иммунной резистентности, защищающее животных-реципиентов от интрацеребрального заражения вирулентной культурой *B. pertussis* 18323.

Иммунизация экспериментальных животных бесклеточной коклюшной вакциной вызывает образование антител, которое по титрам в РА и ИФА не отличается от ответа на цельноклеточную (табл. 6).

Таблица 6

**Уровень антител в сыворотках крови морских свинок, иммунизированных бесклеточным, цельноклеточным препаратами и ОСО-3**

Препарат	Уровень антител (средняя геометрическая титра)					
	после первой прививки			после второй прививки		
	РА*	ИФА**		РА*	ИФА**	
		бесклеточный иммуносорбент	корпускулярный иммуносорбент		бесклеточный иммуносорбент	корпускулярный иммуносорбент
Бесклеточный	174,5 [71,1-428,3]	92,9 [51,8-166,9]	47,8 [21,3-107,3]	1522,19 [643,7-3599,4]	228,5 [166,6-213,4]	221,1 [159,4-306,6]
Корпускулярный	190,3 [35,2-1027,2]	70,88 [19,2-261,2]	52,6 [15,5-178,9]	1522,19 [725,3-3194,5]	216,6 [122,4-383,4]	206,1 [123,5-343,9]
ОСО-3	439,1 [85,2-2262,9]	47,7 [15,8-143,8]	46,5 [19,6-110,7]	1076,35 [373,0-3105,8]	138,9 [77,2-150,1]	219,2 [143,2-335,6]

\* - величина обратная разведению; \*\* - условные иммуноферментные единицы.

Можно с уверенностью предполагать сходство репертуара специфичностей образующихся антител. Сыворотки кроликов, иммунизированных бесклеточной коклюшной вакциной пассивно защищают мышей также, как сыворотки кроликов, иммунизированных цельноклеточной (табл. 7), однако уступают последним в опытах нейтрализации заражающей дозы *B. pertussis in vitro* (табл. 7).

Как видно из табл. 7, ЕД<sub>50</sub> сывороток кроликов, иммунизированных как бесклеточной, так и цельноклеточной вакциной, равна 0,029 мл. Максимальная доза (0,5 мл) сыворотки кроликов, иммунизированных бесклеточной вакциной нейтрализует *in vitro* 22,34 LD<sub>50</sub> *B. pertussis*, в то же время сыворотка кроликов, иммунизированных цельноклеточной вакциной нейтрализует *in vitro* 58,77 LD<sub>50</sub>.

Установлено, что аффинность антител, вырабатываемых при использовании цельноклеточного и бесклеточного препарата, не отличается (табл. 8).

Таблица 7

**Характеристика протективных свойств противokoлюшных сывороток в тестах пассивной защиты и реакции нейтрализации**

Препарат	Пассивная защита				Реакция нейтрализации			
	объем сыворотки	количество животных в опыте	количество выживших животных	ЕД <sub>50</sub> , мл	кол-во клеток	количество животных в опыте	количество выживших животных	Кол-во LD <sub>50</sub>
Бесклеточная вакцина	1	10	8	0,029	100000	10	0	22,34
	0,2	10	5		20000	10	3	
	0,004	10	4		4000	10	8	
	0,0008	10	0		800	10	7	
					160	10	9	
Корпускулярная вакцина	1	10	7	0,029	100000	10	3	58,77
	0,2	10	5		20000	10	5	
	0,004	10	3		4000	10	7	
	0,0008	10	2		800	10	8	
					160	10	10	
Неиммунная сыворотка	1	10	2	-	100000	10	0	-
	0,2	10	1		20000	10	0	
	0,004	10	0		4000	10	1	
	0,0008	10	0		800	10	3	
					160	10	6	

Таблица 8

## Сравнительная оценка аффинности антител

Иммуносорбент	Индекс аффинности, %	
	антитела к цельноклеточному препарату	антитела к бесклеточному препарату
Цельноклеточный	85,0±4,1	73,2±6,2
Бесклеточный	74,3±6,1	84,3±4,3

Учитывая важную роль клеточного звена иммунного ответа, в развитии противокклюшного иммунитета, провели оценку влияния коклюшных вакцин на пролиферативный ответ лимфоцитов в культурах с Т-клеточным митогеном на 14-е сутки после вакцинации. Мононуклеарные клетки крови морских свинок культивировали в присутствии разных концентраций ФГА и без стимуляции. Установлено, что уровень пролиферативного ответа животных, иммунизированных коклюшными препаратами, в культурах с внесением разных концентраций ФГА достоверно выше, чем в контроле. Как видно из табл. 9, иммуномодулирующая активность бесклеточного препарата более выражена в культурах с концентрацией ФГА 20 мкг/мл. Полученные результаты важны для обоснования используемых рядом авторов иммунотерапевтических подходов при неинфекционных заболеваниях с использованием вакцин *B. pertussis*.

Для дополнительной характеристики развивающегося иммунного ответа мононуклеарные клетки крови морских свинок, иммунизированных цельноклеточным и бесклеточным препаратами, культивировали в присутствии взвеси клеток *B. pertussis*.

Таблица 9

## Иммуномодулирующая активность коклюшных препаратов в реакции бласттрансформации лимфоцитов с Т-клеточным митогеном

Препарат	Концентрация ФГА			
	20 мкг	10 мкг	5 мкг	без митогена
Цельноклеточный	4,0757±	3,9083±	3,6912±	3,4134±
	0,2720*	0,3424*	0,3005*	0,1200*
	(11905)	(8096)	(4911)	(2591)
Бесклеточный	4,4665±	4,2128±	3,7599±	3,6671±
	0,0468**	0,0911*	0,1868*	0,0658*
	(29275)	(16325)	(5754)	(4646)
Контроль	2,9527±	3,2292±	3,2693±	2,3131±
	0,0809	0,0555	0,0394	0,0352
	(897)	(1695)	(1859)	(205)

Примечание. Приведены значения  $M \pm m$  для показателей  $\log_{10}$  имп/мин, в скобках – средняя геометрическая имп/мин; \* –  $p < 0,05$  по отношению к контролю; # –  $p < 0,05$  по отношению к цельноклеточному препарату.

Показано, что уровень пролиферативного ответа в группах, иммунизированных коклюшными препаратами, отличается от контрольной группы. При этом не отмечается достоверного отличия уровня пролиферативной активности в ответ на стимуляцию коклюшной суспензией у животных, иммунизированных цельноклеточным и бесклеточным препаратами (табл. 10).

Таблица 10

**Пролиферативный ответ лимфоцитов морских свинок, иммунизированных коклюшными вакцинами, на взвесь коклюшных бактерий *in vitro***

Антиген	Препарат иммунизации		
	цельноклеточный	бесклеточный	контроль
Коклюшная суспензия	3,9906±	4,1624±	2,3131±
	0,3238*	0,0672*	0,0435
	(9787)	(14535)	(206)
Без антигена	3,4134±	3,6671±	2,3131±
	0,1200*	0,0658*	0,0352
	(2591)	(4646)	(205)

Примечание. Приведены значения  $M \pm m$  для показателей  $\log_{10}$  имп/мин; в скобках – средняя геометрическая имп/мин; \* –  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Отсутствие значимых отличий в уровне пролиферативной активности, вызванной бесклеточным и цельноклеточным препаратами, позволяет говорить об их сопоставимой иммуногенности. Обращает на себя внимание повышение спонтанной пролиферации лимфоцитов в культурах без антигена, что, по-видимому, является отражением стимуляции лимфоцитов *in vivo*.

Выраженность клеточноопосредованного иммунного ответа оценивали в реакции ГЗТ. Установлено, что использование цельноклеточной вакцины вызывает более выраженное иммунное воспаление в сравнении с бесклеточным препаратом (табл. 11).

Таблица 11

**Выраженность иммунного воспаления через 24 ч после разрешающей инъекции антигена**

Препарат	Индекс реакции ( $M \pm m$ )	
	по толщине стопы	по массе стопы
Бесклеточный	37,3±3,3	16,9±3,5
Цельноклеточный	46,9±2,9	33,0±5,0
<i>p</i>	<0,05	<0,05

Для интегральной характеристики процессов рекрутирования иммунокомпетентных клеток в регионарный лимфатический узел и их пролиферации *in situ* исследовали изменение клеточности и массы подколенных лимфатических узлов. Установлено, что выраженность ответа со стороны периферических органов иммунной системы сопоставима в сравниваемых группах (табл. 12).

Таблица 12

**Выраженность изменения массы и клеточности регионарных лимфатических узлов**

Препарат	Индекс реакции ( $M \pm m$ )	
	по массе лимфатических узлов	по количеству ядросодержащих клеток
Бесклеточный	54,9 $\pm$ 5,9	77,7 $\pm$ 3,8
Цельноклеточный	56,0 $\pm$ 2,9	82,91 $\pm$ 1,3
<i>p</i>	>0,05	>0,05

Дополнительные исследования показали, что при использовании исследуемых препаратов существенно отличается временная динамика развития воспалительного ответа. При введении цельноклеточной вакцины реакция достигает своего максимума через 6 ч, тогда как при использовании бесклеточной вакцины максимум ответа приходится на 24 ч. Морфологическое изучение зоны воспаления показало, что через 6 ч после иммунизации цельноклеточной вакциной в мягких тканях наблюдается обильный клеточный воспалительный инфильтрат вокруг мелких единичных очагов некроза волокнистой ткани и скелетных мышц. В центральных отделах инфильтрата преобладают нейтрофильные гранулоциты, многие из которых находятся в состоянии распада, в периферических участках инфильтрата доминируют гистиоциты (макрофаги). Встречаются также равномерно рассеянные немногочисленные эозинофильные гранулоциты (рис. 2). При иммунизации бесклеточным препаратом через 6 ч наблюдается очаговая обильная клеточная воспалительная инфильтрация смешанного характера. Индекс реакции по толщине стопы при использовании бесклеточной вакцины составляет 44,92 $\pm$ 3,9, а корпускулярной - 56,9 $\pm$ 8,1. Таким образом, выраженность в этот временной период воспалительного ответа, в генезе которого с учетом морфологической картины важная роль может принадлежать повреждению иммунными комплексами, ниже при использовании бесклеточной вакцины. Через 24 ч после иммунизации цельноклеточной вакциной отмечаются обширные некрозы мягких тканей, стенок сосудов. Центральные отделы инфильтрата образованы разрушающимися нейтрофильными грануло-

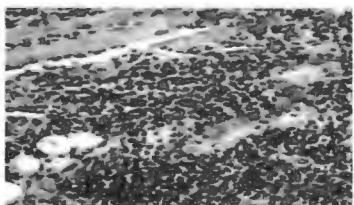


цитами (микроабсцессы) и макрофагами. В периферических отделах преобладают округлые и веретеновидные гистиоциты без признаков распада. Перифокальный отёк резко выражен (см. рис. 2).



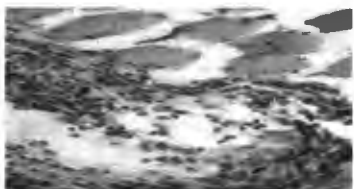
Через 6 ч после разрешающей инъекции коклюшной суспензией, иммунизация тем же препаратом.

Гематоксилин и эозин,  $\times 80$ .



Через 24 ч после разрешающей инъекции коклюшной суспензией, иммунизация тем же препаратом.

Гематоксилин и эозин,  $\times 80$ .



Через 24 ч после разрешающей инъекции бесклеточным коклюшным препаратом, иммунизация тем же препаратом.

Гематоксилин и эозин,  $\times 80$ .

**Рис. 2. Зона воспаления в стопе после разрешающего введения исследуемых препаратов.**

Для мышей, иммунизированных бесклеточной вакциной, характерно преобладание в центральных отделах инфильтрата нейтрофильных гранулоцитов, а по периферии - макрофагов. Степень выраженности перифокального очагового отека варьирует от незначительного до умеренного. Выявляется полнокровие сосудов, единичные очаги кровоизлияний (см. рис. 2). Таким образом, в отличие от бесклеточного препарата воспалительный ответ при разрешающем введении цельноклеточной вакцины характеризуется более выраженными явлениями вторичной альтерации.

#### **Получение и оценка иммуобиологических свойств комбинированных вакцин с бесклеточным коклюшным компонентом**

Новая бесклеточная коклюшная вакцина была включена как компонент в АКДС вместо цельноклеточной. Комбинированные вакцины аАКДС и АКДС

сравнивали между собой и с вакциной Инфанрикс, также содержащей бесклеточный коклюшный компонент. Результаты оценки гуморального ответа морских свинок на иммунизацию тремя комбинированными вакцинами представлены в табл. 13.

В то же время при выявлении коклюшных антител в ИФА на подложке иммобилизованной взвесью коклюшных бактерий или бесклеточным препаратом в сыворотках крови свинок, иммунизированных вакциной Инфанрикс, определялись достоверно меньшие титры, чем у животных, иммунизированных АКДС и аАКДС (табл. 13).

Содержание дифтерийных антител в сыворотках крови свинок, иммунизированных вакцинами аАКДС и Инфанрикс, было достоверно ниже, чем после иммунизации АКДС-вакциной, при этом обе вакцины с бесклеточным коклюшным компонентом не отличались по способности стимулировать образование антител к дифтерийному анатоксину. Титр столбнячных антител при иммунизации вакциной Инфанрикс был значимо ниже титров, полученных в ответ на иммунизацию АКДС и аАКДС вакцинами. Между средними титрами столбнячных антител в сыворотках крови свинок, иммунизированных вакцинами АКДС и аАКДС, достоверных отличий не обнаружено.

Таблица 13

**Уровень специфических антител в сыворотках морских свинок, иммунизированных комбинированными вакцинами, с различными коклюшными компонентами**

Препарат	Уровень антител (средняя геометрическая титра)				
	коклюшных			дифтерийных	столбнячных
	РА	ИФА			
		бесклеточный антиген	коклюшная суспензия		
аАКДС	861,38 [380,62-1949,34]	228,5 [166,6-213,4]	206,01 [131,80-322,02]	1,11 [0,62-1,98]*	9,12 [ 5,41-15,38]
АКДС	1493 [745,38-2991,11]	512,75 [283,75-926,55]	392,66 [210,08-733,92]	3,55 [2,48-5,07]	14,79 [10,04-21,80]
Инфанрикс	951,03 [674,83-1340,29]	39,55 [22,16-71,98]*#	130,66 [91,29-187,06]*	0,89 [052-1,53]*	2,12 [1,44-3,11]*#

Примечание. \* -  $p < 0,05$  в сравнении с группой, иммунизированной АКДС-вакциной; # -  $p < 0,05$  в сравнении с группой, иммунизированной аАКДС-вакциной.

Считается, что в дополнение к выработке антител необходимо формирование клеточного иммунитета для обеспечения невосприимчивости к коклюшной инфекции (Matoo, Cherry, 2005). Поэтому оценка специфического клеточного иммунитета в виде реакции ГЗТ представляется нам весьма важной как в плане характеристики иммунобиологических свойств комбинированных вакцин, так и в отношении возможного использования полученных данных для контроля эффективности вакцинации. Установлено, что уровень иммунного воспаления при использовании АКДС-вакцины достоверно выше, в сравнении с вакцинами, содержащими бесклеточный коклюшный компонент (табл. 14). При этом уровень ответа со стороны регионарных лимфатических узлов сопоставим по своей выраженности (табл. 15).

Таблица 14

**Выраженность иммунного воспаления через 24 ч после разрешающей инъекции антигена**

Препарат	Индекс реакции $M \pm m$	
	по величине отека	по массе стопы
АКДС	32,62 $\pm$ 7,51	27,90 $\pm$ 3,18
аАКДС	14,45 $\pm$ 1,55*	12,49 $\pm$ 1,12*
Инфанрикс	16,55 $\pm$ 2,13*	16,12 $\pm$ 2,65*

Примечание. \* -  $p < 0,05$  в сравнении с группой АКДС

Таблица 15

**Выраженность изменения массы и клеточности регионарного лимфатического узла через 24 ч после разрешающей инъекции антигена**

Препарат	Индекс реакции $M \pm m$	
	по массе лимф. узлов	по количеству (ЯСК)
АКДС	53,7 $\pm$ 8,64	75,5 $\pm$ 2,46
аАКДС	59,2 $\pm$ 7,42	81,1 $\pm$ 1,13
Инфанрикс	54,3 $\pm$ 8,35	84,5 $\pm$ 1,55

Примечание. \* -  $p < 0,05$  в сравнении с группой АКДС.

В сравнительном экспериментально-лабораторном (доклиническом) исследовании новой бесклеточной коклюшной вакцины установлена её безвредность и высокая протективная, а также иммуногенная активность. Результаты исследования позволяют рассматривать препарат в качестве кандидата для клинических испытаний I фазы.

## ВЫВОДЫ

1. В экспериментах на животных установлено, что бесклеточная коклюшная вакцина нетоксична и не обладает сенсибилизирующими свойствами.

2. Показано, что новая бесклеточная коклюшная вакцина подобно цельноклеточной защищает мышей от интрацеребрального заражения вирулентным штаммом *B. pertussis* 18323, а также способна формировать клетки иммунологической памяти, которые функционируют при сингенном переносе протективного иммунитета на модели внутримозговой коклюшной инфекции у мышей.

3. Установлено, что новая бесклеточная коклюшная вакцина не уступает цельноклеточной по способности стимулировать образование специфических антител. Показано, что аффинность антител, формирующихся в ответ на вакцинацию бесклеточным и цельноклеточным препаратами, не отличается.

4. Показано, что уровень пролиферации лимфоцитов в культурах с коклюшной суспензией при иммунизации животных бесклеточным и цельноклеточным препаратами, повышается в одинаковой степени в сравнении с контролем. Выраженность пролиферативного ответа лимфоцитов в культурах с оптимальной концентрацией фитогемагглютинина при иммунизации бесклеточной коклюшной вакциной выше, чем при введении цельноклеточного коклюшного препарата.

5. Установлено, что разрешающее введение цельноклеточной коклюшной вакцины при сенсибилизации коклюшной суспензией или АКДС-вакциной в тесте гиперчувствительности вызывает более выраженные проявления вторичной альтерации в сравнении с бесклеточным препаратом.

6. Замена в вакцине АКДС цельноклеточного коклюшного компонента на новый бесклеточный создает новую комбинированную вакцину, которая не уступает традиционной по иммуногенной активности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Устюгов Я.Ю. Локальные иммунные и морфологические изменения при введении компонентов вакцины «Бубо-Кок» / Я.Ю. Устюгов, А.Н. Крючков, А.Ю. Увицкий, Л.Е. Увицкая // Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии: Материалы межрегион. конф. молодых ученых – Пермь, 2002. – С. 105-106.
2. Устюгов Я.Ю. Морфологические и гистологические изменения при введении вариантов клеточной и бесклеточной противокклюшных вакцин / Я.Ю. Устюгов, А.Ю. Увицкий // Биология – наука XXI века: Материалы международной конф. молодых ученых – Пушкино, 2004. – С. 132.
3. Увицкий А.Ю. Изменения при введении комбинированных вакцин и их компонентов. / А.Ю. Увицкий, Я.Ю. Устюгов, А.М. Николаева, В.Д. Семенова // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, про-

изводство, применение: Материалы всерос. научн. конф. с междунар. участием - Уфа, 2005. - Часть 1. - С. 82-84.

4. Устюгов Я.Ю. Локальные морфологические изменения при введении корпускулярной противокклюшной вакцины. / Я.Ю. Устюгов, А.Ю. Увицкий // Студент и научно-технический прогресс: Материалы международной научной конференции серия биология НГУ. - Новосибирск, 2005. - С. 77-78.

5. Николаева А.М. Опыт разработки и доклинической оценки бесклеточного варианта противокклюшной вакцины. / А.М. Николаева, В.Д. Семенова, А.Ю. Увицкий, Я.Ю. Устюгов // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран содружества: Материалы международной научно-практич. конф. - Минск-Нарочь, 2005. - С. 155-156.

6. Увицкий А.Ю. Изучение иммуногенности бесклеточного варианта коклюшной вакцины в опытах на животных. / А.Ю. Увицкий, Я.Ю. Устюгов, В.Н. Сперанская // Современная вакцинопрофилактика: Материалы научно-практич. конф. - Пермь, 2005. - С. 113-117.

7. Увицкий А.Ю. Взаимная иммуноадыювантность комбинированных вакцин, как причина усиления локальной реактогенности при повторном введении / А.Ю. Увицкий, Я.Ю. Устюгов, А.М. Николаева, В.Д. Семенова, А.Н. Крючков // Вестник уральской медицинской академической науки. - 2006. - № 3-1. - С. 245-248.

8. Устюгов Я.Ю. Изучение иммунобиологической активности варианта бесклеточной коклюшной вакцины / Я.Ю. Устюгов, А.Ю. Увицкий, А.М. Николаева, В.Д. Семенова // Вестник уральской медицинской академической науки. - 2006. - № 3-1. - С. 248-251.

9. Устюгов Я.Ю. Изучение иммуномодулирующего действия корпускулярного и ацеллюлярного коклюшных вакцинных препаратов в реакции бласт-трансформации лимфоцитов / Я.Ю. Устюгов, А.М. Николаева // Российский иммунологический журнал. - 2008. - № 2-3. - С. 339.

10. Устюгов Я.Ю. Изучение влияния коклюшных вакцин на клеточный и гуморальный иммунный ответ у животных / Я.Ю. Устюгов, А.М. Николаева, Л.Е. Увицкая // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы всерос. научно-практич. конф. - Пермь, 2008. - С. 21-22.

11. Устюгов Я.Ю. Протективная активность бесклеточной коклюшной вакцины в тесте адоптивного переноса иммунитета / Я.Ю. Устюгов, А.М. Николаева, // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы всерос. научно-практич. конф. - Пермь, 2008. - С. 23-24.

---

Подписано в печать 01.10.2008. Усл. печ. л. 1,0.  
Формат 90×60/16. Набор компьютерный. Тираж 100 экз.  
Заказ № 732/2006.

---

Отпечатано в ИД «Пресстайм»  
Адрес: 614025, г. Пермь, ул. Героев Хасана, 105



17-